

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07K 15/00, C12N 15/86 C12P 21/08, A61K 39/245</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 93/19092 (43) Date de publication internationale: 30 septembre 1993 (30.09.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00256 (22) Date de dépôt international: 19 mars 1992 (19.03.92)</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR). CANCER RESEARCH CAMPAIGN IN LONDON [GB/GB]; University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD (GB).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; Laboratoire de Génétique des Virus Oncogènes, Institut Gustave-Roussy PR 2, 39, rue Camille-Desmoulins, F-94805 Villejuif (FR). RAGOT, Thierry [FR/FR]; 12A, rue Charles-Infroit, F-92190 Meudon (FR). FINERTY, Susan [GB/GB]; MORGAN, Andrew, J. [GB/GB]; University of Bristol, Department of Pathology, The Medical School, University Walk, Bristol BS8 1TD (GB).</p>		<p>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: DEFECTIVE RECOMBINANT ADENOVIRUSES EXPRESSING CHARACTERISTIC EPSTEIN-BARR VIRUS PROTEINS</p> <p>(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS DEFECTIFS EXPRIMANT DES PROTEINES CARACTERISTIQUES DU VIRUS EPSTEIN-BARR</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A recombinant vector characterized in that it includes a genomic sequence of a defective adenovirus, i.e. one that lacks the sequences needed for it to replicate, as well as an insert including one or more DNA sequences coding for any characteristic protein of the Epstein-Barr Virus (EBV) which can induce the formation in a patient of EBV-protective neutralizing antibodies and, if required, protective cells, particularly cytotoxic and helper lymphocytes, said insert being under the control of a promoter present in or pre-inserted into the adenovirus genome. Said vector may be used to produce vaccines for diseases caused by EBV in humans or animals.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend, d'une part, une séquence génomique d'un adénovirus défectif, c'est-à-dire dépourvue des séquences nécessaires à sa réplication, et, d'autre part, un insérat comprenant une ou plusieurs séquences d'ADN codant pour toute protéine caractéristique du virus Epstein-Barr (EBV) qui soit susceptible d'induire chez un individu la formation d'anticorps neutralisants protecteurs contre l'EBV et, le cas échéant de cellules protectrices, notamment des cellules T cytotoxiques et T helper, cet insérat étant placé sous le contrôle d'un promoteur présent ou préalablement inséré dans le génome de l'adénovirus. Il est applicable à la production de vaccins dirigés contre les pathologies provoquées par l'EBV chez l'homme ou l'animal.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS DEFECTIFS EXPRIMANT DES PROTEINES
CARACTERISTIQUES DU VIRUS EPSTEIN-BARR

L'invention a pour objet des adénovirus recombinants défectifs pour la réplication exprimant des glycoprotéines caractéristiques du virus Epstein-Barr, notamment des glycoprotéines d'enveloppe majeures de ce virus, ainsi que l'utilisation de ces adénovirus recombinants dans des compositions vaccinales dirigées contre les pathologies provenant de l'infection d'un individu par le virus Epstein-Barr (EBV).

Le virus Epstein-Barr est présent à l'état latent dans une fraction des lymphocytes B de la grande majorité des adultes. Ce virus herpès est responsable de la mononucléose infectieuse et est étiologiquement associé au lymphome endémique de Burkitt et au carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC) (Epstein et Achong, 1979, 1986). Il est également impliqué dans les lymphomes apparaissant chez les patients immunodéprimés, comme les individus ayant subi une greffe d'organe ou encore les malades atteints du SIDA (Thomas et Crawford, 1989). Plus récemment ce virus a été associé avec certains types de lymphomes de Hodgkin (Mueller et col., 1989; Pallesen et col., 1991).

La prévention ou le contrôle de ces maladies par vaccination a fait l'objet de nombreuses recherches (Epstein, 1976), surtout dans le cas du NPC qui atteint jusqu'à 2 % de la population mâle du Sud de la Chine et

d'autre régions à haute incidence telles que l'Asie du Sud-Est ou à moyenne incidence comme l'Afrique de Nord.

L'EBV représente donc un problème majeur de santé dans le monde. Il n'est malheureusement pas possible d'utiliser l'EBV en tant que vaccin vivant car il se réplique très faiblement in vitro et transforme les lymphocytes B humains in vivo.

Les glycoprotéines majeurs d'enveloppe de l'EBV, à savoir les protéines gp340 et gp220, proviennent toutes les deux du même gène viral par un phénomène d'épissage sans changement du cadre de lecture (Beisel et col., 1985), et sont exprimées à la surface externe des virions et à la membrane des cellules infectées. Ces protéines se lient au récepteur cellulaire CR2 (CD21) du composant C3d du complément (Fingerroth et col., 1984; Tanner et col., 1988) et sont capables d'induire chez l'homme la formation d'anticorps neutralisant l'EBV (Thorley-Lawson et Poodry, 1982). Les anticorps monoclonaux dirigés contre gp340/220 neutralisent également le virus in vitro (Hoffman et col., 1980). Ces glycoprotéines induisent une réponse cellulaire (cellules T) (Uleato et col., 1988; Bejarano et col., 1990) ainsi qu'une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Qualtière et col., 1982) et induit également la formation d'anticorps neutralisants.

Des singes tamarins cottontop ont été protégés avec succès contre le lymphome induit par l'EBV par un vaccin à base de gp340 purifiée à partir de cellules B95/8 (Epstein et col., 1985; Morgan et col., 1988a et 1989). Cependant la quantité de gp340 directement obtenue à partir d'EBV est trop insuffisante pour permettre d'envisager d'utiliser des protéines purifiées à partir d'EBV en tant que vaccin. D'autre part, les préparations

obtenues peuvent être contaminées par l'ADN de l'EBV, ce qui n'est pas acceptable en vaccination humaine.

L'utilisation de vaccins à base de protéines recombinantes de l'EBV obtenues par transformation de bactéries ou levures par des séquences nucléotidiques codant pour ces protéines s'est heurtée au problème de l'absence de glycosylation ou de glycosylations différentes des polypeptides obtenus de celles normalement observées dans les cellules de mammifères. Ces protéines sont par conséquent faiblement immunogènes ou induisent des réponses immunitaires inadaptées chez le lapin (Emini et col., 1988).

Des vecteurs recombinants ont été réalisés en utilisant des vecteurs viraux recombinants exprimant le gène codant pour gp340/gp220, comme le virus de la vaccine (Mackett et Arrand, 1985) et le virus varicelle-zoster (Lowe et col., 1987). La protection contre le lymphome induit par l'EBV a été obtenue en utilisant comme vecteur une souche de laboratoire du virus de la vaccine (WK) mais n'a pas été obtenue à l'aide d'une souche vaccinante du virus plus atténuée (Wyeth) (Morgan et col., 1988b). Toutefois, seule une souche atténuée du virus de la vaccine est utilisable dans le cadre d'une vaccination contre l'EBV à l'aide de vaccine recombinante, ce qui limite par conséquent l'efficacité de ce type de vaccin.

Un des buts de la présente invention est de fournir des compositions vaccinales contre les pathologies provoquées par l'infection d'un individu par EBV, qui présentent à la fois l'avantage:

- de pouvoir être produites en quantité suffisante à un prix de revient avantageux,
- de protéger efficacement les individus contre EBV en conférant une immunité cellulaire (cellules T "helper" et

cytotoxiques) et par production d'anticorps protecteurs contre EBV,

- de ne pas risquer de contaminer l'entourage des individus traités avec ces compositions et donc de pouvoir être utilisées en toute sécurité.

La présente invention a pour objet des acides nucléiques recombinants caractérisés en ce qu'ils comprennent, d'une part, une séquence génomique d'un adénovirus défectif, c'est à dire dépourvue des séquences nécessaires à sa répllication, et, d'autre part, un insérat comprenant une ou plusieurs séquences d'ADN codant pour toute protéine caractéristique de l'EBV qui soit susceptible d'induire chez un individu la formation d'anticorps neutralisants protecteurs contre l'EBV et, le cas échéant de cellules protectrices, notamment des cellules T cytotoxiques et T helper, cet insérat étant placé sous le contrôle d'un promoteur présent ou préalablement inséré dans le génome de l'adénovirus.

Avantageusement, la séquence génomique de l'adénovirus défectif sus-mentionné comprend néanmoins celles des séquences qui dans ce génome sont le support de l'information génétique nécessaire à l'adénovirus correspondant pour pénétrer dans les cellules infectables par celui-ci, et, le cas échéant, l'ensemble des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus.

L'invention vise plus particulièrement l'utilisation de ces acides nucléiques en tant que vecteurs pour la transformation de cellules humaines ou animales.

A ce titre, le promoteur, sous le contrôle duquel est placé l'insérat sus-mentionné, est avantageusement susceptible d'être reconnu par les polymérases (et plus particulièrement les polymérases II) de cellules humaines ou animales infectables par ce virus (représentant un

grand nombre de types cellulaires différents), ce promoteur étant notamment le promoteur fort majeur tardif (MLP) de l'adénovirus humain de type 2 (Levrero et col., 1991) ou tout autre promoteur ubiquitaire connu.

Les adénovirus, notamment les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5), représentent des vecteurs particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, pour les raisons suivantes: de façon générale, les adénovirus sont relativement stables, peuvent se cultiver facilement et rapidement (cycle viral de 30 h), donnent des titres particulièrement élevés (jusqu'à 10⁴ à 10⁵ unités formant plaque ou u.f.p. par cellule infectée). Les types 2 ou 5 sont plus particulièrement préférés car ces sérotypes ne sont pas oncogènes chez le rongeur comme par exemple le sérotype 7, la séquence complète de leur génome viral a été établie (Chrobozek et col., 1992), leur biologie moléculaire a été intensivement étudiée, enfin, de nombreux mutants, en particulier des mutants de délétion ont été obtenus, rendant possible l'insertion de fragments d'ADN de grande taille (Berkner, 1988).

Avantageusement, la ou les séquence(s) d'ADN susmentionnée(s), codant pour toute protéine caractéristique d'EBV, est ou sont comprise(s) dans un génome défectif d'adénovirus, ce génome étant dépourvu des séquences nucléotidiques essentielles nécessaires à la réplication de ce virus dans des cellules permissives, et plus particulièrement des séquences codant pour la région E1, et, le cas échéant pour la région E3. Cette région E1 comprend le gène immédiatement précoce E1A qui active les autres unités de transcription précoces du virus et est donc nécessaire à sa réplication, et le gène E1B qui est responsable de la transformation complète des cellules en culture en présence de E1A. Le génome défectif

d'adénovirus comprend néanmoins préférentiellement l'ensemble des séquences essentielles nécessaires à la constitution d'un stock viral sur des cellules (cellules 293) complétant la région E1 (E1A + E1B) du virus.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, les séquences d'ADN étranger sus-mentionnées sont insérées en lieu et place de la région E1 du génome d'Ad5, région permettant l'insertion de plusieurs gènes codant pour des protéines immunogéniques.

De préférence, le génome des vecteurs recombinants selon l'invention comprend une séquence d'ADN codant pour une glycoprotéine d'enveloppe majeure de l'EBV, et plus particulièrement pour la glycoprotéine gp340 ou gp220 d'EBV, ou pour tout fragment de ces protéines qui soit susceptible d'induire la formation d'anticorps protecteurs contre l'EBV chez un individu, et, le cas échéant, de cellules protectrices du système immunitaire, notamment des cellules T cytotoxiques et T helper.

D'autres vecteurs recombinants particulièrement avantageux dans le cadre de la présente invention sont ceux dont le génome comprend une séquence d'ADN codant pour un antigène de membrane de l'EBV impliqué dans le mécanisme de fusion de l'enveloppe virale de l'EBV avec la membrane des lymphocytes B et des cellules épithéliales, et plus particulièrement la glycoprotéine gp85 (Haddad et col., 1989), ou pour tout fragment de cette protéine susceptible d'induire la formation d'anticorps protecteurs ou de cellules protectrices tels que définis ci-dessus.

Des vecteurs préférés selon l'invention sont ceux comprenant à la fois un acide nucléique d'insertion codant pour une glycoprotéine d'enveloppe majeure de l'EBV, et plus particulièrement pour la glycoprotéine

gp340 ou gp220 de l'EBV, ou pour tout fragment de ces protéines tel que défini ci-dessus, et un acide nucléique d'insertion codant pour un antigène de membrane de l'EBV impliqué dans le mécanisme de fusion de l'enveloppe virale de l'EBV avec la membrane cellulaire de cellules de l'organisme, et plus particulièrement la glycoprotéine gp85 ou pour tout fragment de cette protéine tel que défini ci-dessus.

Avantageusement, le génome des vecteurs selon l'invention comprend également une séquence d'ADN codant pour une protéine stimulant le système immunitaire, et plus particulièrement la réponse cellulaire (cytokines).

A ce titre la présente invention a pour objet des vecteurs tels que décrits ci-dessus et dont le génome comprend une séquence d'ADN codant pour l'interleukine-2, l'interleukine-3, l'interleukine-4, l'interleukine-5, l'interleukine-6, l'interleukine-7, ou tous fragments de ces dernières susceptibles de stimuler le système immunitaire.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un ou une combinaison de plusieurs vecteurs recombinants tels que décrits ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable (adjuvants, complexes immunostimulants).

L'invention a plus particulièrement pour objet des vaccins dirigés contre les pathologies provoquées par l'EBV chez l'homme ou l'animal, ces compositions vaccinales comprenant un ou plusieurs vecteurs recombinants tels que décrits ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

A ce titre la présente invention a pour objet des méthodes de prévention, d'atténuation ou de traitement de pathologies provoquées par l'EBV chez l'homme ou

l'animal, ces méthodes comprenant l'administration chez l'homme ou l'animal susceptible d'être infecté par EBV ou risquant de l'être, d'un vaccin ou d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

L'utilisation d'adénovirus non répliquables dans le cadre de la présente invention offre l'avantage d'une part d'éviter la contamination de l'entourage des individus traités à l'aide de ces vecteurs, et, d'autre part, d'éviter d'obtenir chez les individus traités une trop forte immunisation contre les protéines caractéristiques de l'adénovirus, et plus particulièrement contre les protéines de la capside (hexons et fibre), autorisant ainsi la réalisation de plusieurs immunisations en toute sécurité.

La quantité de vecteurs administrée dans l'organisme est avantageusement choisie de manière à provoquer une réponse immunitaire appropriée dirigée essentiellement contre les antigènes vaccinaux insérés dans le vecteur viral chez l'organisme dans lequel ils sont injectés.

Avantageusement les voies d'administration choisies dans le cadre de la présente invention sont les voies intramusculaire, intranasale ou la voie orale sous la forme de capsules gastro-protégées susceptibles de délivrer le vecteur viral au niveau de l'épithélium intestinal.

Parmi les pathologies susceptibles d'être prévenues ou traitées par les compositions de l'invention, on peut citer principalement: la mononucléose infectieuse, le lymphome endémique de Burkitt, le carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC), les lymphomes apparaissant chez les patients immunodéprimés, comme les individus ayant subi une greffe d'organe ou encore les malades atteints du SIDA, ou encore certains types de lymphomes de Hodgkin où l'EBV est impliquée.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention des vecteurs recombinants décrits ci-dessus qui comprend après l'étape de construction proprement dite de ces vecteurs par introduction d'une ou plusieurs séquence(s) d'ADN étranger dans leur génome, une étape de transformation de lignées cellulaires transformables d'eucaryotes supérieurs (notamment d'origine humaine ou animale) comportant elles-mêmes une séquence distincte d'ADN apte à compléter la partie du génome de l'adénovirus essentielle pour la répllication de ce dernier et dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite séquence distincte étant de préférence incorporée au génome des cellules de ladite lignée cellulaire.

A titre d'exemple préféré de telles lignées cellulaires, on mentionnera la lignée 293 (Graham et col., 1977), lignée de rein embryonnaire humain qui contient, intégrés dans son génome, les onze premiers pourcents de l'extrémité gauche du génome d'un adénovirus de type 5 (Ad5). Ceux-ci permettent de compléter des virus recombinants défectifs qui portent des délétions de cette région. Un tel procédé d'obtention est plus particulièrement décrit dans la demande de brevet européen n° 0 185 573 du 20/11/85.

Après transformation de ces lignées cellulaires, les vecteurs qui se sont ainsi multipliés sont récupérés et purifiés.

La présente invention sera davantage détaillée dans la description qui suit de la construction d'un adénovirus vecteur recombinant comprenant le gène codant pour les glycoprotéines gp340/220.

I. METHODES

a) Cellules et virus

La lignée cellulaire 293 rénale embryonnaire humaine transformée par Ad-5 (Graham et col., 1977), a été utilisée pour la transfection d'ADN ainsi que pour la multiplication et la titration d'Ad. En effet, la lignée cellulaire 293 complète les fonctions des gènes E1A et E1B et permet donc la réplication de l'Ad défectif. Pour la construction de l'Ad recombinant, l'Ad5-dl324 humain, portant des délétions dans les régions E1 (3.9-10.5 m.u.) et E3 (78.5-84.3 m.u.), a été utilisé (Shenk et Williams, 1984). Les lignées cellulaires 293, Hela et Vero ont été maintenues dans un milieu de culture minimum essentiel Eagle avec 10 % de sérum de veau fœtal.

b) Plasmides

Le vecteur d'expression eucaryote pMLP10 a été décrit dans l'article de Levrero et col., 1991.

Les plasmides pL1C et pL2C contiennent le promoteur tardif majeur Ad2 (MLP) joint à sa séquence leader (séquence de tête) tripartite, suivi par la région codant pour les glycoprotéines gp340 et 220 de l'EBV et son signal de polyadénylation ou par la séquence provenant d'un clone d'ADN complémentaire (ADNc) d'une version épissée de l'ARNm, correspondant à la région codant uniquement pour la gp220. De plus, les constructions pL1CD et pL2CD ont été obtenues à partir des plasmides précédents, après suppression des régions d'ADN correspondant aux domaines transmembranaires et cytoplasmiques des protéines et addition d'un codon stop et d'un signal de polyadénylation du gène codant pour l'antigène précoce du virus SV40 (Tosoni-Pittoni et col., 1989).

c) Transfection d'ADN et isolement de virus recombinants

Les adénovirus recombinants ont été obtenus par recombinaison in vivo. Des fragments d'ADN viraux ainsi que des plasmides linéarisés ont été transfectés dans les cellules 293 en utilisant la méthode de précipitation au phosphate de calcium (Graham et Van Der Eb, 1973). Des plages de lyse ont été isolées 10 jours après, et le virus a été amplifié en culture. L'ADN viral a été extrait par la procédure Hirt (Graham et col., 1977) et les virus recombinants ont été identifiés, cartographiés avec des enzymes de restriction.

d) Identification et quantification de gp340/220 d'EBV

- immunofluorescence (IF) : l'immunofluorescence indirecte de membrane a été réalisée sur les lignées cellulaires Hela ou Vero 24 heures après infection avec les virus recombinants (Ad-gp340, Ad-gp220) ou avec Ad-dl324 en tant que contrôle négatif. En résumé, les cellules ont subi un traitement à la trypsine et ont été resuspendues pendant 2 h à la concentration de 10^6 cellules par ml dans un milieu ne comprenant pas de sérum. 2×10^6 cellules ont été récupérées et resuspendues dans 500 μ l d'anticorps monoclonal anti-gp340/220 (New England Nuclear) dilués 100 fois dans un tampon phosphate pendant 1 h à 37°C. Un anticorps anti-IgG de souris conjugué à de la fluorescéine a été additionné et les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 37°C. Les cellules lavées ont été examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

- immunoprécipitation : cette technique a été décrite pour l'isolement de gp340/220 provenant du milieu de culture dans l'article de Tosoni-Pittoni et col., 1989. Les extraits de cellules radiomarquées ont été obtenues à partir de 10^7 cellules infectées éclatées par sonication.

e) détection des anticorps anti gp340/220

- immunofluorescence : des séries de dilution des sérums ont été analysées par IF sur des cellules 293 fixées dans un mélange acétone/méthanol (1:1), et préalablement transfectées avec un plasmide exprimant gp340/220 (PL1C) afin de déterminer les niveaux en anticorps anti-gp340/220 (Tosoni-Pittoni et col., 1989).
- expérience de neutralisation : cette expérience a été réalisée selon la technique de la transformation abortive des cellules lymphoïdes avec l'EBV (De Schryver et col., 1974).

f) Inoculation d'animaux avec les adénovirus recombinants

- Inoculation de lapins

Afin d'être inoculés, les adénovirus ont tout d'abord été purifiés par deux passages dans des gradients de densité de chlorure de césium, et ont été dialysés et dilués dans du PBS avant inoculation. Des lapines New Zeland ont été inoculées par différentes voies avec 10^{10} u.f.p. (en admettant qu'une unité de densité optique à 260 nm obtenue pour la suspension virale équivaut à 3×10^{10} u.f.p./ml) d'Ad recombinant ou d'Ad-dl324 en tant que contrôle négatif.

- Inoculation des tamarins cottontop

Six animaux ont été utilisés, dont il avait été préalablement vérifié qu'ils ne possédaient pas d'anticorps dirigés contre gp340/220 de l'EBV par ELISA, contre les antigènes tardifs de l'EBV (VCA) par immunofluorescence et enfin contre les protéines de capside de l'adénovirus par immunofluorescence. L'Ad recombinant exprimant gp340/220 (Ad-gp340) a été utilisé pour immuniser quatre tamarins cottontop. Un animal (R155

sur la figure 4) a été vacciné avec un Ad non recombinant de contrôle (souche Ad-dl324) et un autre animal n'a pas été immunisé (B159). Les animaux ont été vaccinés par trois injections intramusculaires. La première dose a été de 5.10^9 u.f.p. dans un ml de solution tamponnée, et comme les tamarins ne présentaient pas de réactions néfastes, les deux doses suivantes ont été respectivement de 10^{10} u.f.p. et de 2.10^{10} u.f.p. aux 5ème et 13ème semaines après la première injection. Les titres des anticorps dirigés contre les protéines de la capsid de l'adénovirus et contre la gp340 de l'EBV ont été mesurés toutes les semaines. Les échantillons de plasma de tamarin sont testés pour la réponse anticorps contre gp340 par ELISA et pour la réponse anticorps contre les antigènes de capsid de l'adénovirus par immunofluorescence.

II. RESULTATS

a) Construction des adénovirus recombinants

Les adénovirus contenant le gène EBV gp340/220 sous le contrôle de MLP Ad2 ont été construits de la manière illustrée sur la figure 1. Afin d'obtenir les plasmides de série IX, un fragment BglIII-HindIII (nucléotides 3329 à 6242) d'Ad5 a été cloné entre les sites BamHI et HindIII des plasmides pL1C, pL2C ou SphI (suivi par réparation des extrémités d'ADN avec la polymérase de Klenow) et HindIII des plasmides pL1CD et pL2CD. Cette séquence de 3 kpb contient le gène de la protéine IX complète qui est nécessaire pour obtenir l'ADN viral jusqu'à 97 % de sa taille normale (Ghosh-Choudhury et col., 1987) et permet la réalisation de la recombinaison in vivo dans les cellules.

La reconstruction des Ad recombinants est décrite dans la légende de la figure 1.

b) Expression des glycoprotéines gp340/220 par des adénovirus recombinants

La capacité des adénovirus recombinants à exprimer les glycoprotéines gp340/220 a été testée sur différentes lignées cellulaires. Les cellules 293, Hela et Vero ont été infectées avec 1, 10, 100, 1000 u.f.p./cellule, et récupérées chaque jour jusqu'à 36 h, 4 jours ou 7 jours après transfection respectivement. L'expression de gp340/220 la plus forte a été observée avec les cellules Hela 3 jours après infection (figure 2B, puits 5). Les protéines membranaires dérivés de l'EBV produites par les recombinants Ad-gp340 et Ad-220 ont été marquées à l'aide de méthionine ³⁵S (figure 2A, puits 1,2), sont correctement glycosylées et ont pu être détectées à la surface de cellules humaines infectées par immunofluorescence membranaire avec différents anticorps monoclonaux (figure 3). De la même manière, les formes sécrétées de ces protéines ont pu être détectées par immunoprécipitation à partir de milieux de cultures cellulaires dans lesquels les recombinants Ad-gp340D et Ad-gp220D ont été utilisés pour l'infection (figure 2A, puits 3,4; figure 2B, puits 1, 4 et 5). D'autre part, l'immunoprécipitation des extraits cellulaires humains dans ce cas ne montre seulement que les précurseurs de glycosylation de gp340/220 tronqués (figure 2B, puits 3). Après l'infection, les cellules continuent de sécréter les glycoprotéines recombinantes qui peuvent s'accumuler dans le milieu de culture sans subir de protéolyse apparente (figure 2B, puits 4 et 5).

c) Réponse anticorps chez les lapins inoculés avec les adénovirus recombinants exprimant EBV gp340/220 (tableau 1)

Les réponses anticorps dirigés contre gp340/220 ont été suivies chez les lapins après injection d'Ad recombinant. Les schémas d'immunisation sont résumés sur le tableau 1. Après inoculation intraveineuse, intranasale, ou intramusculaire, d'une première dose de virus recombinants Ad-gp340 ou Ad-gp220 hautement purifiés (exprimant les glycoprotéines de membrane), les anticorps anti-gp340/220 ont été détectés deux semaines plus tard chez tous les animaux excepté chez un lapin (lapin n° 33). Après une seconde injection, un effet de renforcement a été observé sur les animaux qui présentent alors une forte réponse anticorps une semaine plus tard. Des titres relativement hauts ont été détectés 30 semaines après la dernière inoculation. Ces anticorps peuvent reconnaître les cellules exprimant gp340/220 par immunofluorescence et les protéines gp340/220 par immunoprécipitation (figure 2 A) et par immunotransfert selon la technique Western. Il n'y a pas de différence apparente entre gp340 et gp220 en ce qui concerne leur capacité à induire des anticorps spécifiques.

Les titres anti-gp340/220 obtenus par inoculation de lapin avec l'Ad-gp340D recombinant (exprimant les glycoprotéines sous forme sécrétée) sont bien plus faibles, et une réponse à long terme n'a pu être observée.

Différentes voies d'inoculation ont été testées. Les injections intramusculaire et intraveineuse sont aussi efficaces l'une que l'autre. L'introduction intranasale d'Ad déclenche une première réponse lente mais des titres similaires en anticorps ont été obtenus après la seconde vaccination (lapin 68).

Les sérums anti-gp340/220 positifs provenant de lapins immunisés se sont révélés être tous capables de fortement neutraliser le virus (voir dernière colonne du tableau 1).

d) Réponse anticorps chez les tamarins inoculés avec les adénovirus recombinants exprimant EBV gp340/220

Trois semaines après la deuxième injection, les 4 animaux qui ont reçu le virus recombinant développent des anticorps contre gp340 avec des titres allant de 1/100 à 1/280. Le titre de ces anticorps atteint des valeurs de 1/440 à 1/1520 trois semaines après la troisième injection. Les 5 animaux inoculés avec l'adénovirus (incluant celui qui a reçu le virus parental), développent des anticorps contre les antigènes de capsid du virus compris entre 1/80 et 1/640 après la 2ème injection et 1/640 à 1/280 après la troisième injection. Aucun anticorps spécifique n'est détecté chez l'animal non immunisé.

e) Protection des singes tamarins contre les lymphomes induits par l'EBV

Trois semaines après la troisième injection, les 6 tamarins (y compris l'animal de contrôle non immunisé) ont reçu une injection par voie intra-péritonéale avec une dose 100% tumorigénique d'EBV (dans un délai de 3 semaines) à partir d'un stock de virus préparé à partir de la lignée cellulaire B95/8. Les 6 animaux ont été alors régulièrement examinés par palpation externe et mesure de la taille des ganglions lymphatiques et des tumeurs ainsi induites.

L'animal R155 qui a reçu le virus parental développe de façon très rapide la maladie avec implication à la

fois des ganglions lymphatiques périphériques et abdominaux.

L'animal a du être sacrifié le 25^e jour après l'injection de l'EBV. L'animal non immunisé (B159) développe également les mêmes symptômes. A l'opposé, les quatre tamarins immunisés avec l'Ad recombinant exprimant gp340 sont clairement protégés et ne développent pas la maladie après l'injection de l'EBV. Seuls quelques ganglions lymphatiques ont été transitoirement repérés gonflés, d'une taille de 3 mm sur 3 mm de diamètre contre 14 mm sur 12 mm de diamètre pour les animaux non protégés. De plus les tissus obtenus après biopsie ne présentent pas de caractéristiques tumorales comme chez les animaux de contrôle.

III. ANALYSE DES RESULTATS

Les inventeurs ont mis en évidence l'expression de gènes étrangers dans de nombreuses lignées cellulaires infectées à l'aide d'adénovirus recombinants. En particulier, la forme secrétée de gp340/220 d'EBV a pu être facilement purifiée à partir d'un milieu ne contenant pas de sérum. Cela suggère la présence d'un système de transformation post-traductionnelle hautement efficace sécrétant ces séquences polypeptidiques. De plus, pendant l'infection, les cellules sécrètent les glycoprotéines qui s'accumulent alors dans le milieu cellulaire. Cela permet de fournir une bonne source d'antigènes pour la fabrication d'un vaccin sans risquer une contamination par de l'ADN de l'EBV. Dans les constructions de la présente invention, les séquences codant pour les antigènes servant à l'immunisation ou codant pour les cytokines sont placées sous le contrôle du promoteur majeur tardif (promoteur ubiquitaire) d'Ad2,

suit par la séquence leader tripartite dans son intégralité; ces séquences d'ADN sont clonées dans la région E1 du virus. En effet, les ARNm ne contenant seulement que le premier exon de la séquence leader sont traduits 20 fois moins efficacement (Thummell et col., 1983; Davis et col., 1985). Des adénovirus recombinants récemment décrits pour l'expression in vivo de gènes étrangers utilisent un site de clonage dans la région E3 sans délétion du gène E1 (Morin et col., 1987; Johnson et col., Schneider et col., 1989).

L'utilisation de virus vivants recombinants en tant que vecteurs vaccinaux présentent beaucoup d'avantages par rapport à un vaccin sous-unité. Ces avantages comprennent la possibilité de produire des glycoprotéines virales en l'absence d'ADN de l'EVB, l'obtention des modifications post-traductionnelles correctes et d'une présentation appropriée de l'antigène aux cellules T effectrices, un large spectre de réponses immunes, l'induction d'une mémoire immunologique à long terme, et enfin un faible coût de production et une facilité d'inoculation du vaccin (particulièrement dans le cas d'utilisation d'un vaccin gastro-encapsulé). Mais l'inconvénient principal de l'utilisation des virus recombinants vivants est le large spectre d'hôtes et la possibilité de transmission horizontale entre les humains et les autres espèces. Dans le cas de la vaccine et du virus de la polio, la transmission à des individus immunodéprimés par l'intermédiaire du contact avec des individus vaccinés présente de graves conséquences.

La présente invention démontre qu'un Ad5 recombinant présentant une délétion dans la région E1 permet l'expression in vivo de produits de gènes étrangers et peut induire la formation d'anticorps neutralisants chez les lapins contre ces produits. Les inventeurs ont émis

l'hypothèse que l'insertion dans la région E1 pouvait avoir plusieurs avantages, dont notamment le fait d'empêcher le virus de se répliquer in vivo chez les hôtes permissifs, en particulier chez l'homme et par conséquent de limiter les risques de dissémination des virus recombinants, ceux-ci ne pouvant alors réaliser qu'un seul cycle d'infection dans les cellules animales. Un autre avantage pouvait être celui d'empêcher une forte immunisation contre les protéines de la capsid d'Ad et de permettre des vaccinations multiples sans affecter la qualité de l'immunisation contre les antigènes étrangers exprimés par ce virus.

Ces différents aspects sont particulièrement importants dans le domaine de la sécurité et pour le développement potentiel d'Ad recombinant en tant que vaccin.

Les différences trouvées au niveau des titres anti-gp340/220 entre les formes membranaires et secrétées de gp340/220 peuvent être expliquées par les différentes présentations des antigènes aux cellules T suivant le fait que l'antigène est à la surface des cellules présentant l'antigène ou secrété. Il a déjà été démontré que l'addition d'une séquence d'ancrage conduit à une augmentation nette des taux d'anticorps reconnaissant un antigène étranger (Langford et col., 1986). L'absence totale de réponse anticorps lors de l'utilisation de la forme secrétée de gp220 est plus surprenante. La gp220 tronquée doit être moins stable in vivo mais il est plus probable encore que la conformation adoptée par cette protéine recombinante lorsque le domaine d'ancrage a été supprimé soit faiblement immunogénique chez les lapins. Une autre hypothèse serait que l'unique domaine de la gp340 qui contient trois répétitions d'un motif amphopathique de 21 acides aminés (Beisel et col., 1985)

pourrait être important dans le déclenchement de la réponse anticorps, particulièrement lorsque les protéines sont sous forme secrétée.

Les sérums anti-gp340/220 positifs obtenus à partir de lapins immunisés sont tous fortement capables de neutraliser l'EBV. Les sérums anti-gp340/220 dirigés contre l'Ad recombinant exprimant les gp340/220 secrétées neutralisent également l'EBV *in vitro* malgré des titres beaucoup plus faibles. Ces résultats correspondent avec le fait que la gp220 secrétée et des formes tronquées de gp220 dans la partie C-terminale, sont toujours susceptibles de se lier au récepteur de l'EBV (CR2) à la surface des lymphocytes B (Tanner et col., 1988). Des mutations plus précises sont nécessaires à l'intérieur de l'extrémité N-terminale de gp340/220 afin d'identifier le domaine de liaison à CR2. Néanmoins, ce travail constitue une étape préliminaire vers l'identification des épitopes gp340/220 impliqués dans la réponse immune en termes de liaison des anticorps avec la gp340 et de neutralisation du virus.

La réponse anticorps a été démontrée comme pouvant persister six mois de façon appréciable chez le lapin. Il est important d'obtenir une protection à long terme après la vaccination.

Comme une réponse en anticorps neutralisant l'EBV *in vivo* a été obtenue chez les lapins vaccinés à l'aide d'Ad recombinant produisant les protéines de membrane gp340/220, les recombinants Ad-gp340/220 ont été testés avec succès quant à sa capacité à protéger des tamarins cottontop contre les lymphomes induits par l'EBV (voir figure 4).

La possibilité de délivrer les adénovirus par l'intermédiaire de plusieurs voies d'inoculation dont les voies intramusculaire, intranasale, intrapéritonéale,

sous-cutanée ou orale, fait de ces adénovirus des outils performants pour l'expression in vivo de gènes étrangers. La possibilité d'obtenir une réponse immune aussi efficace par introduction intranasale du virus rend ce dernier très prometteur du point de vue de développement d'un vaccin. Les adénovirus ont une affinité particulière pour la paroi gastrointestinale et des voies respiratoires supérieures, pour les amygdales et les glandes salivaires chez l'homme et certains vertébrés. L'utilisation d'Ad recombinant est par conséquent particulièrement avantageuse pour la vaccination contre l'EBV qui se réplique au niveau des sites sus-mentionnés, particulièrement en induisant la sécrétion d'anticorps susceptibles de protéger l'épithélium oropharyngé.

Tableau 1

Virus type	Animal	Voies	Titre en anticorps (a) semaine après la 1ère injection					Neutralisation de l'EBV (b)
			0	4	7	25	40	
Ad-gp340	30	iv	-	16	256	512	S	+++
	31	iv	-	512	1024	256	256	
	32	iv	-	128	256	256	S	
	33	iv	-	-	-	128	S	
	34	iv	-	512	1024	S		
	35	iv	-	512	2048	256	S	
	36	im	-	1024	1024	256	256	
	38	im	-	1024	2048	S		
	63	in	-	32	512	S		
Aa-gp220	40	iv	-	1024	1024	128	256	+++ / ++
	41	iv	-	2048	1024	64	64	
	42	iv	-	2048	1024	128	S	
	43	iv	-	256	128	-	S	
	44	iv	-	2048	512	256	64	
	45	iv	-	512	256	256	128	
	46	iv	-	1024	512	16	S	
	47	iv	-	1024	1024	256	S	
	48	im	-	512	256	128	S	
	49	im	-	1024	512	256	4	
Aa-gp340D	54	iv	-	128	16	-	S	++
	55	iv	-	256	-	-	S	
	56	iv	-	512	-	-	S	
	57	iv	-	64	-	-	S	
	58	iv	-	8	16	-	S	
	59	iv	-	64	8	-	S	
	60	im	-	256	8	-	S	
	61	im	-	64	32	8	S	
Ad-gp220D 65-67	65-67	iv	-	-	-	ND	S	ND
Ad dl324	80	iv	-	-	-	S		.

LEGENDE DES FIGURES ET DU TABLEAU 1Figure 1 : Construction des adénovirus recombinants

La séquence d'ADN codant pour gp340/220 a été insérée dans le vecteur d'expression pMLP10. Ce plasmide comprend 450 nucléotides de l'extrémité gauche du génome d'Ad5 (c'est-à-dire la répétition terminale inversée contenant l'origine de réplication virale, la séquence nécessaire à l'encapsidation du virus et la séquence activatrice de la région E1A) suivis de la séquence comportant le promoteur majeur tardif d'Ad2 flanqué de la séquence leader tripartite. Les plasmides pLCIX, pL2CIX, pLCDIX et pL2CDIX contiennent les différentes séquences permettant l'expression des diverses formes de gp340/220 décrites dans les sections "méthodes" et "résultats".

Les adénovirus recombinants sont obtenus par recombinaison homologue in vivo entre le grand fragment du génome viral obtenu après clivage par une enzyme de restriction et la séquence homologue existant chez les plasmides décrits ci-dessus (9,4 - 17 % du génome). Le mélange d'ADN comprenant le fragment du génome viral (2,6 à 100 % du génome) purifié après clivage par l'enzyme de restriction Cla I et le plasmide linéarisé par le même enzyme de restriction est transfecté dans les cellules 293. Les virus recombinants dénommés respectivement Ad-gp340, Ad-gp220, Ad-gp340D et Ad-gp220D sont alors isolés.

Cadres : séquences virales (blanc : génome viral ; hachuré : gène des glycoprotéines ; n ir : séquences de SV40).

Cadre fléché : promoteur MLP; trait fin : séquence bactérienne. D/A : sites donneur et accepteur d'épissage.

1 m.u. = 1 % du génome viral = 360 paires de bases.

Figure 2 : Détection des gp340/2220 par immunoprécipitation.

Gel de polyacrylamide montrant les glycoprotéines gp340/220 immunoprécipitées à partir de cellules infectées avec les Ad recombinants titrant à 1000 u.f.p. (unité formant plaque) par cellule. Les protéines radiomarquées ont été extraites à partir de 2.10^6 cellules ou à partir du milieu de culture correspondant au même nombre de cellules pour les formes sécrétées.

A : protéines détectées 48 h après infection des cellules Hela par un sérum polyclonal de lapin positif (puits 1-4) ou le sérum préimmun (puits 5), soit à partir d'extraits cellulaires (puits 1 et 2) ou du milieu de culture concentré dans les puits 3 à 5. Les virus employés pour l'infection des cellules sont : Ad-gp340, 2 : Ad-gp220, 3 : Ad-gp340, 4-5 : Ad-gp220D.

B : protéine gp 220 détectée 48 h (puits 4) ou 72 h (autres puits) après l'infection des cellules Vero (1-3) ou Hela (4 et 5) avec un anticorps monoclonal anti-gp340/220 à partir du milieu de culture (puits 1, 2, 4 et 5) ou d'extraits cellulaires (puits 3).

Figure 3 : Immunofluorescence de membrane.

Des cellules Vero sont infectées par le virus recombinant Adgp220 à 10 u.f.p./cellule et traitées avec un anticorps monoclonal antigp340/220 et un anti-IgG de souris conjugué fluorescent.

Figure 4 : Protection chez les singes tamarins cottontop après vaccination.

Trois semaines après la troisième injection, (semaine 16), les animaux sont testés avec une dose 100 % lymphomagène ($10^{5,3}$ unités transformantes), conduisant à

l'apparition de tumeurs dans les 21 jours. Le graphe montré sur la figure est obtenu en portant l'index tumoral de chaque animal (qui représente la somme des diamètres des ganglions lymphatiques palpables et des nodules tumoraux détectables en mm) contre le temps en jours après l'injection de l'EBV. Ronds blancs : animal immunisé par le virus parental, sacrifié 25 jours après le début de l'expérience; carrés blancs : animal non immunisé.

Tableau 1 : Réponse anticorps chez les lapins inoculés avec les Ad recombinants.

(a) : titres des anticorps anti-gp340 détectés par immunofluorescence. Le titre des sérums est exprimé comme l'inverse de la dernière dilution positive détectée.

(b) : le test de neutralisation est basé sur la transformation abortive des cellules lymphoïdes avec l'EBV. (-) : résultat négatif. (S) : animal sacrifié ou mort au cours de la période d'expérimentation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Beisel, C., et col., (1985), Journal of Virology 54, 665-674.

Bejarano, M., T., et col., (1990), Journal of Virology 64, 1398-1401.

Berkner, K.L. (1988), Biotechniques 6, 616-629.

Chroboezek, J., et col., (1992), Virology 186, 280-285.

Davis, A.R., et col., (1985), Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 82, 7560-7564.

De Schryver, A., et col., (1974), International Journal of Cancer 13, 353-362.

Emini, E.A., et col., (1988), Virology 166, 387-393.

Epstein, M.A. (1976), Cancer Research 38, 711-714.

Epstein, M.A. & Achong B. G. (1979), The Epstein-Barr Virus. Springer-Verlag, Berlin.

Epstein, M.A. & Achong, B.G. (1986), The Epstein-Barr Virus : Recent Advances. Heinemann Medical Books, London.

Epstein, M.A., et col., (1985), Nature 318, 287-289.

Fingerroth, J., et col., (1984), Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 81, 4510-4516.

Ghosh-Choudhury, G., et col., (1987), EMBO Journal 6, 1733-1739.

Graham, F.L. & Van Der Eb, A.J. (1973), Virology 52, 456-467.

Graham, F.L. et col., (1977), Journal of General Virology 36, 59-72.

Haddad, R.S., et Hutt-Fletcher, L.M., (1989), Journal of Virology 63, 4998-5005.

Hoffmann, G.J., et col., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 77, 2979-2983.

Johnson, D.C., et col., (1988), Virology 164, 1-14.

Langford, C.J., et col., (1986), Molecular and Cellular Biology 6, 3191-3199.

Levrero, M., et col., (1991), Gene 101, 195-202

Lowe, S.R., et col., (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 84, 3896-3900.

Mackett, M. & Arrand, J. (1985), EMBO Journal 4, 3229.

Morgan, A.J. et col., (1988a), Journal of General Virology 69, 2093-2096.

Morgan, A.J. et col., (1988b), Journal of Medical Virology 25, 189-195.

Morgan, A.J. et col., (1989), Journal of Medical Virology 69, 74-78.

Morin, J.E., et col., (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 84, 4626-4630.

Mueller, N., et col., (1989), The New England Journal of Medicine 320, 689-695.

Pallesen, G., et col., (1991), The Lancet 337, 320-322.

Qualtiere, L.F. et col., (1982), Journal of Immunology, 129, 814-818.

Schneider M. et col., (1989), Journal of General Virology 70, 417-427.

Shenk, T. & Williams, J. (1984), Current Topics in Microbiology and Immunology 111, 1-39.

Tanner, J., et col., (1988), Journal of Virology 62, 4452-4464.

Thomas, J.A. & Crawford, D.H. (1989), The Lancet 1, 1075-1076.

Thorley-Lawson, D.A. & Poodry, C.A. (1982), Journal of Virology 43, 730-736.

Thumell, C., et col., (1983), Cell 33, 455-464.

Tosoni-Pittoni, E., et col., (1989). Biochemical Biophysical Research Communication 158, 676-684.

Uleato, D., et col., (1988), European Journal of Immunology, 18, 1689-1697.

REVENDICATIONS

1. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend, d'une part, une séquence génomique d'un adénovirus défectif, c'est à dire dépourvue des séquences nécessaires à sa réplication, et, d'autre part, un insérat comprenant une ou plusieurs séquences d'ADN codant pour toute protéine caractéristique de l'EBV qui soit susceptible d'induire chez un individu la formation d'anticorps neutralisants protecteurs contre l'EBV et, le cas échéant de cellules protectrices, notamment des cellules T cytotoxiques et T helper, cet insérat étant placé sous le contrôle d'un promoteur présent ou préalablement inséré dans le génome de l'adénovirus.

2. Vecteur recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence d'ADN codant pour la glycoprotéine gp340 ou gp220 du virus Epstein-Barr (EBV), ou pour tout fragment de ces protéines qui soit susceptible d'induire la formation d'anticorps protecteurs contre l'EBV chez un individu, et, le cas échéant, de cellules protectrices, notamment des cellules T cytotoxiques et T "helper".

3. Vecteur recombinant selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence d'ADN codant pour un antigène de membrane d'EBV impliqué dans le mécanisme de fusion de l'enveloppe virale d'EBV avec la membrane des lymphocytes B et des cellules épithéliales, et plus particulièrement la glycoprotéine gp85, ou pour tout fragment de cette protéine susceptible d'induire la formation desdits anticorps protecteurs ou cellules protectrices.

4. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence génomique de l'adénovirus défectif comprend néanmoins

celles des séquences qui dans ce génome sont le support de l'information génétique nécessaire à l'adénovirus correspondant pour pénétrer dans les cellules infectables par celui-ci, et, le cas échéant, l'ensemble des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus.

5. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le génome de l'adénovirus non répliquable ou défectif est dépourvu des séquences nucléotidiques de la région E1 nécessaires à la répllication de cet adénovirus.

6. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le génome de l'adénovirus comprend également une séquence d'ADN codant pour une protéine stimulant le système immunitaire.

7. Vecteur recombinant selon la revendication 6, caractérisé en ce que le génome de l'adénovirus comprend un acide nucléique d'insertion codant pour une ou plusieurs interleukines choisies parmi les interleukines-2, -3, -4, -5, -6, -7 ou tout fragment de ces dernières susceptibles de stimuler le système immunitaire.

8. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) selon l'une des revendications 1 à 7, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

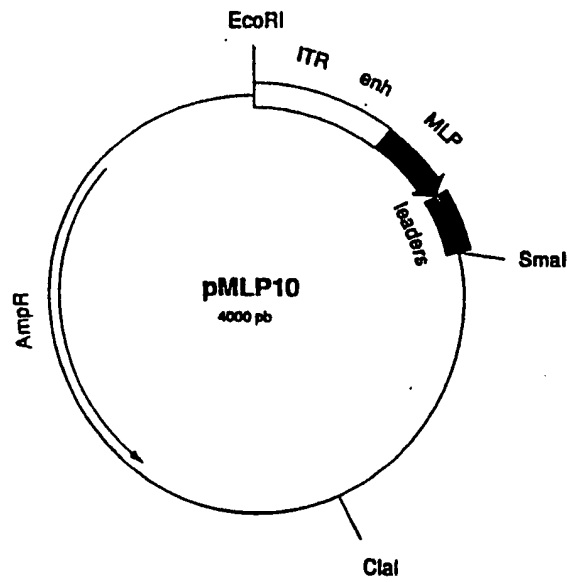
9. Vaccin dirigé contre les pathologies provoquées par l'EBV chez l'homme ou l'animal, cette composition vaccinnante comprenant un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) selon l'une des revendications 1 à 7, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10. Méthode de prévention ou de traitement de pathologies provoquées par EBV chez l'homme ou l'animal,

cette méthode comprenant l'administration chez l'homme ou l'animal susceptible d'être infecté par l'EBV ou risquant de l'être, d'un vaccin ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 9 ou la revendication 8 respectivement.

11. Méthode selon la revendication 10 caractérisée en ce qu'elle permet la prévention ou le traitement de la mononucléose infectieuse, du lymphome endémique de Burkitt, du carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC), des lymphomes apparaissant chez les patients immunodéprimés, comme les individus ayant subi une greffe d'organe ou encore les malades atteints du SIDA, et de certains types de lymphomes de Hodgkin.

1 / 5



Clonage de gènes codant pour les
glycoprotéines dans un vecteur
pMLP10 à base d'Ad

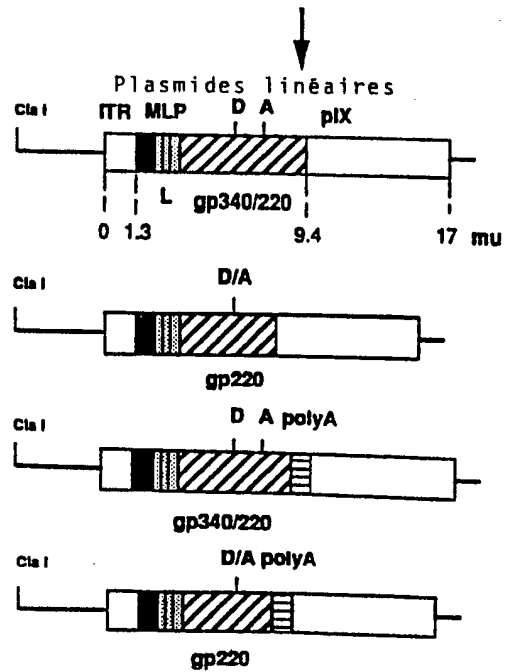
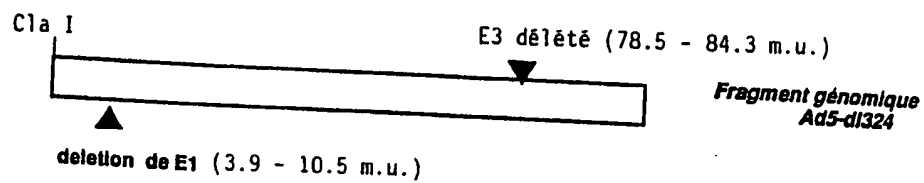


FIGURE 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT
ICA/ED

2 / 5

FIGURE 1 (suite)

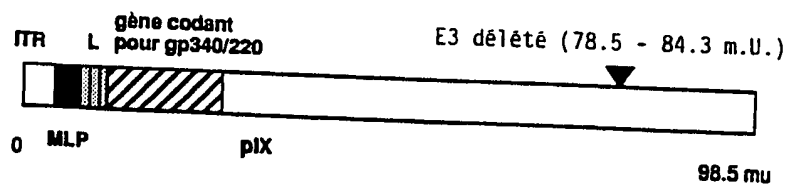


transfection dans les cellules 293

recombinaison *in vivo*



Purification des Ad recombinants



Ad-gp340, Ad-gp220, Ad-gp340D, Ad-gp220D

3 / 5

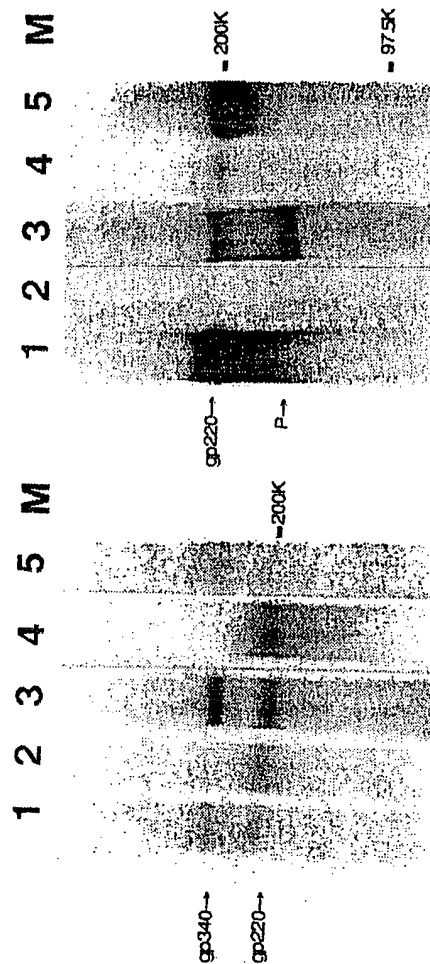


FIGURE 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

WO 93/19092

PCT/FR92/00256

4 / 5

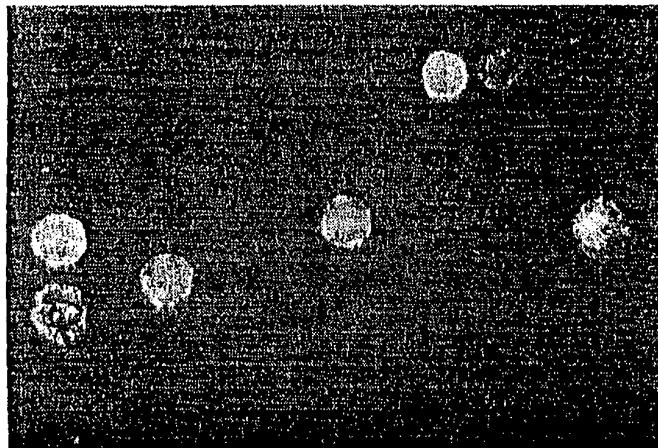
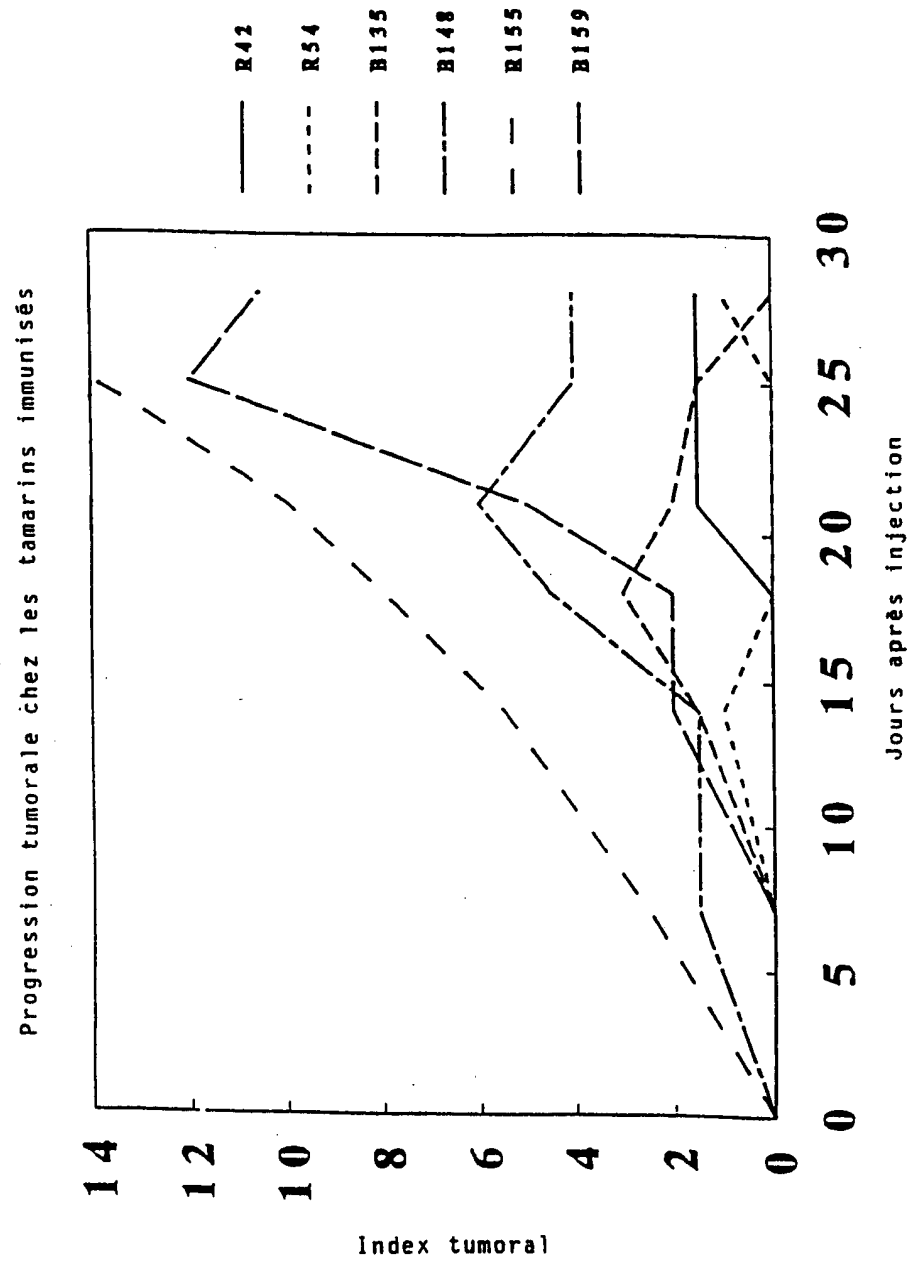


FIGURE 3

FIGURE 4



FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ C 07 K 15/00 C 12 N 15/86 C 12 P 21/08
A 61 K 39/245

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ C07 K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 8800971 (COMMONWEALTH SCIENT. AND IND. RESEARCH ORG. et al.) 11 February 1988, see claims 1-6	6, 7
X	CHEMICAL ABSTRACTS DATABASE, Ohio, US, Ab.No. 116(17):171299x, T. RAGOT et al.: "Recombinant ELA-defective adenoviruses expressing pseudorabies and Epstein-Barr virus glycoproteins induce immunological responses as live vaccines in rabbits and mice" & Colloq. INSERM, 219 [Hum. Gene Transfer], pages 249-260, 1991	1-5, 8, 9
A	EP, A, 0260012 (MERCK & CO. INC.) 16 March 1988, see claims 1-17	1, 2
	./.	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 1992 (11.09.92)

Date of mailing of the international search report

19 October 1992 (19.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00256

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
-----------	--	-----------------------

A	BIOSIS PREVIEWS DATABASE, Philadelphia, US, Ab.No. 88:359107, N. MILLER et al.: "A monoclonal antibody to glycoprotein ***GP85*** inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus" & J. Virol., vol. 62, No. 7, 1988, pages 2366-2372	2,3
---	---	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00256

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10, 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
method of treatment of the human or animal
body:
PCT rule 39.1.4
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200256
SA 58632

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 28/09/92
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8800971	11-02-88	AU-B- 612983	25-07-91
		AU-A- 7789987	24-02-88
		EP-A- 0275300	27-07-88
		JP-T- 1500755	16-03-89
EP-A- 0260012	16-03-88	JP-A- 63141589	14-06-88

EPO FORM P479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No **PCT/FR 92/00256**

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
Int.C1.5	C 07 K 15/00	C 12 N 15/86 C 12 P 21/08
A 61 K 39/245		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Systeme de classification	Symboles de classification	
Int.C1.5	C 07 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁶	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹¹ des passages pertinents ¹²	No. des revendications visées ¹⁴
A	WO,A,8800971 (COMMONWEALTH SCIENT. AND IND. RESEARCH ORG. et al.) 11 février 1988, voir revendications 1-6 ---	6,7
X	CHEMICAL ABSTRACTS DATABASE, Ohio, US, Ab.No. 116(17):171299x, T. RAGOT et al.: "Recombinant E1A-defective adenoviruses expressing pseudorabies and Epstein-Barr virus glycoproteins induce immunological responses as live vaccines in rabbits and mice" & Colloq. INSERM, 219 [Hum. Gene Transfer], pages 249-260, 1991 ---	1-5,8,9
A	EP,A,0260012 (MERCK & CO. INC.) 16 mars 1988, voir revendications 1-17 --- -/-	1,2
<div> <div> <p>⁶ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11-09-1992		19 OCT 1992
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴

(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIOUES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>BIOSIS PREVIEWS DATABASE, Philadelphia, US, Ab.No. 88:359107, N. MILLER et al.: "A monoclonal antibody to glycoprotein ***GP85*** inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus" & J. Virol., vol. 62, no. 7, 1988, pages 2366-2372</p> <p>-----</p>	2,3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR92/00256

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°^{es} 10.11 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
methode de traitement chez l'homme ou l'animal:
regle 39.1 4 PCT
2. ☐ Les revendications n°^{es} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°^{es} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200256
SA 58632

46

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/09/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8800971	11-02-88	AU-B- 612983	25-07-91
		AU-A- 7789987	24-02-88
		EP-A- 0275300	27-07-88
		JP-T- 1500755	16-03-89
EP-A- 0260012	16-03-88	JP-A- 63141589	14-06-88

EPO FORM 1047Z

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82